

Ekspresi caspase 9 pada kultur Bone Marrow Stem Cell (BMSCs) dengan kondisi hipoksia

by Ernie Maduratna Setiawati

Submission date: 24-Mar-2018 03:49PM (UTC+0800)

Submission ID: 935444109

File name: PD-4-2-2012-07696-fp.pdf (156.26K)

Word count: 2327

Character count: 13766

Ekspresi caspase 9 pada kultur *Bone Marrow Stem Cell* (BMSCs) dengan kondisi hipoksia

Ernie Maduratna Setiawati¹ Sri Wigati Mardi Mulyani²

¹ Department of Periodontic

² Department of Dentomaxillofacial Radiology

Faculty of Dentistry Airlangga University

Surabaya - Indonesia

Jl. Prof.Dr. Moestopo 47 Surabaya

Email. swigati.nina@gmail.com

Abstract

Background : Bone marrow stem cells (BMSCs) have demonstrated potential for periodontal regenerative medicine strategies. Hypoxia condition was necessary to support bone marrow stem cell viability. Therefore, it is necessary to prove scientifically what the influence hypoxia precondition to the evidence of apoptosis on BMSCs culture. **Objective.**The purpose of this study to explore the effects of hypoxia on BMSCs on caspase 9 expression . **Methods.** Research design used experimental laboratories. The isolation of stem cells was made culturing the mesenchymal stem cells derived from crista illiaca of the bone marrow from male rabbits. Stem cell culture was performed in hypoxic conditions (O₂ 1%,3%,5%) and measured caspase -9 expression using RT-PCR . **Result.** This hypoxic precondition in the culture of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells decrease caspase 9 expression. **Conclusion** : Hypoxic precondition can reduce apoptosis in the culture of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells.

Key word: bone marrow mesenchymal stem cells, hypoxia, caspase 9

Abstrak

Latarbelakang : Bone marrow stem cells (BMSCs) berpotensi untuk pengembangan periodontal regeneratif medicine. Hipoksia berperan penting dalam viabilitas BMSCs. Sehingga perlu penelitian tentang pengaruh kondisi hipoksia terhadap apoptosis pada kultur BMSCs. **Tujuan** : Untuk menganalisis ekspresi caspase 9 pada kultur sel BMSCs pada kondisi hipoksia. **Metode.** Desain penelitian ini adalah ekperimental laboratoris . Isolasi kultur BMSCs dibuat dari sum sum tulang crista illiaca kelinci jantan. Kultur BMSCs dibuat dalam kondisi hipoksia (O₂ 1%,3%,5%) dan di ukur ekspresi caspase 9 dengan menggunakan RT-PCR .Uji statistik yang digunakan : Anova **Hasil** : Kondisi hipoksia pada kultur BMSCs menurunkan ekspresi caspase 9.**Kesimpulan** : Kondisi hipoksia dapat menurunkan apoptosis BMSCs .

1
Kata kunci: bone marrow mesenchymal stem cells, hypoxia, caspase 9

1
Correspondence : Sri Wigati Mardi Mulyani, Departemen of Dentomaxillofacil Radiology Faculty of Dentistry Universitas Airlangga Jl. Prof.Dr. Moestopo 47 Surabaya Indonesia. Email. swigati.nina@gmail.com

PENDAHULUAN

Saat ini konsep pendekatan bioteknologi *stem cell* dikembangkan untuk penatalaksanaan perawatan gigi goyang. Secara klinis konsep ini dilaporkan telah berhasil dalam meregenerasi kulit, epitel cornea, cartilago, tulang dan regenerasi organ yang lebih kompleks seperti regenerasi kandung kemih. Stem cell adalah suatu kelompok sel yang mempunyai kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel lain dan mempunyai kemampuan untuk memperbanyak diri.¹

Konsep terapi stem cell merupakan salah satu harapan baru sebagai terapi pada kasus kasus periodontitis parah. Namun demikian minimnya viabilitas berupa daya tahan hidup dari stem cell yang ditransplantasikan menyebabkan efektifitas terapi stem cell ini menjadi berkurang.² Dugaan sementara yang mendasari menurunnya viabilitas dan fungsi stem cell adalah peningkatan kejadian apoptosis. Hal ini menunjukkan bahwa *microenvironment* pada jaringan yang rusak tidak kondusif untuk mendukung viabilitas stem cell.

Microenvironment yang dimaksud salah satunya adalah kondisi hipoksia.^{3,4}

Kondisi hipoksia merupakan salah satu unsur penting dari *microenvironment* tetapi hal ini sering terabaikan. Pada kultur stem cell secara konvensional selama ini masih dilakukan dengan kondisi normoksia (oksigen dengan konsentrasi 21%). Namun sebaliknya pada kondisi *in vivo* stem cell membutuhkan lingkungan hipoksia antara 1-15% tergantung dari tipe stem cell. Hal tersebut menunjukkan bahwa kultur *in vitro* juga membutuhkan perlakuan yang sama seperti lingkungan fisiologis, agar kesuksesan terhadap terapi dapat dicapai.

Hipoksia sel kultur dapat mengakibatkan terjadinya stress sel yang dapat menginduksi terjadinya apoptosis.⁵ Pada penelitian ini penulis ingin mengkaji peran caspase 9 sebagai indikator apoptosis pada kultur sel dalam kondisi hipoksia. Sampai saat ini belum ada informasi yang jelas tentang bagaimana pengaruh kondisi hipoksia terhadap kejadian apoptosis pada kultur stem cell

secara in vitro. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan pengaruh prekondisi hipoksia terhadap kejadian apoptosis melalui ekspresi Caspase 9 pada kultur BMSCs (Bone marrow stem cells).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah studi eksperimental laboratoris yang dilakukan secara in vitro pada kultur bone marrow stem cell. Kultur BMSCs diberi kondisi hipoksia dengan konsentrasi O_2 1% selama 24 jam, 48 jam, 72 jam dan dibandingkan kondisi normoksia (O_2 21%). Selanjutnya dilakukan analisa terhadap ekspresi Caspase 9. Unit eksperimen pada penelitian ini adalah stem cell mesenchymal (MSCs) yang diambil dari *bone marrow* tulang krista illiaca kelinci *New Zealand* jantan usia 6 bulan dengan berat badan sekitar 900 gram. Penggunaan hewan coba ini dilakukan melalui Laik Etik penelitian di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Stem Cell – Institute Tropical Disease (ITD) Unair Surabaya dan Hiroshima University Japan.

Prosedur isolasi MSCs dari bone marrow diawali dengan pelaksanaan sterilisasi semua

perlengkapan dan reagen, selanjutnya dilakukan anestesi lokal di daerah coxygea pada hewan coba, selanjutnya aspirasi MSCs dari bone marrow dikoleksi dari puncak tulang illiaca dan ditempatkan pada tabung 15 mL Heparin yang sebelumnya diisi dengan 3 mL α -MEM. Masing-masing aspirat di transfer dalam 15 mL tabung steril bertutup biru dan diencerkan dengan 1 X Phosphat Bufer Saline (PBS) steril sampai total volume 8 mL. Masing-masing tabung kemudian dibilas dua kali dengan 5 mL 1 X PBS dan isi dikombinasi dengan larutan aspirat. Pada masing-masing aspirat, diletakkan pada ruang temperatur Ficoll dalam tabung 15 mL terpisah. Selanjutnya dilakukan pelapisan masing-masing aspirat dalam Ficoll. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada 1.600 rpm selama 15 menit pada suhu ruangan. Setelah sentrifugasi selesai, dilakukan koleksi pada lokasi “buffy coat” pada permukaan Ficoll-PBS dengan pipet pasteur steril dan diletakkan dalam tabung 15 mL. Masing-masing sampel dilarutkan dengan 1 X PBS sampai total volume 15 mL, agar campuran merata, tabung

dibolak-balik 3-5 kali. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi kembali dengan kecepatan 1600 rpm selama 10 menit. Langkah berikutnya buang supernatan dan sel-sel yang melayang-layang dengan 6 mL dari CCM sebelum dipanaskan. Kemudian letakkan sel dalam plate sebanyak 10 cm² atau 5 cm². Selanjutnya sel diinkubasi pada suhu 37°C dengan kelembaban 5% CO₂ dibiarkan selama 18-24 jam agar sel melekat. Kira-kira 24 jam kemudian buang media dan sel-sel yang tidak melekat. Selanjutnya tambahkan 5 mL 1 X PBS sebelum dipanaskan dalam kultur, kocok dengan baik dan tutup permukaan area, dan kemudian buang dengan 1 X PBS. Ulangi pencucian 2 kali. Selanjutnya tambahkan 10 menit 10 mL CCM segar pada dish dan masukkan kembali dalam inkubator. Inkubasi sel pada suhu 37°C dengan kelembaban CO₂ 5-10%. Dilakukan pengamatan pada kultur setiap hari dengan mikroskop inverted. Selanjutnya setiap tiga hari, media dibuang, bilas sel dengan 10 mL atau 5 mL 1 X PBS sebelum dipanaskan, buang PBS dan isi dengan 10 mL CCM segar. Dilanjutkan terus

sampai sel confluent antara 60-80%.

Isolasi BMSCs yang didapat secara aseptis kemudian diletakan pada kultur dish dengan densitas 1x10⁶ sel/cm² pada 6 well dengan medium α MEM yang berisi 15% FBS, suplemen simulator BMSCs dan antibiotik (100 U penelitian/ 100 ug/mL streptomycin) pada suhu 37°C, 5% CO₂ dan udara 95%. Sel-sel yang tidak melekat diganti dengan medium baru setelah 72 jam dan selanjutnya setiap 4 hari sekali. Identifikasi sel-sel BMSCs dilakukan menggunakan flowcytometry. Induksi apoptosis pada BMSCs dilakukan dengan kondisi hipoksia yaitu dengan memasukkan flask kultur ke dalam inkubator khusus untuk kondisi hipoksia (modular incubator chamber) yang diatur aliran udaranya berupa 5% CO₂ dan N₂ 95%.

Pemeriksaan ekspresi Caspase 9 dengan kuantitatif RT-PCR.

Kultur sel dicuci dengan PBS 2 ml sebanyak 2 kali kemudian ditambahkan isoRNA sebanyak 1 ml pada masing-masing *well* kemudian tunggu beberapa menit. Kemudian ditambahkan 200 μ l chloroform lalu di

vortex selama 15 detik dan sentrifus 120 x 100 rpm pada suhu 4° C selama 15 menit. Supernatan yang jernih pindahkan ke tip yang baru. Setelah dilakukan sentrifus 120x100 rpm selama 15 menit hingga terlihat pelet pada dasar tabung, cairannya dibuang kemudian ditambahkan 1 ml etanol 70 % . Dilakukan sentrifus 120x100 rpm selama 8 menit kemudian dikeringkan dengan cara membalik tip setelah kering tambahkan 25 µl air. Sampel dimasukkan kedalam inkubator 65° C selama 15 menit, kemudian di masukkan dalam spektrofotometer untuk menghitung konsentrasi RNA. Setelah itu dilakukan analisis mRNA dengan RT-PCR dengan cara menyiapkan reagen master mix sebanyak 8 µl yang terdiri dari air 2.5 µl, universal mix (taqMan) 5 µl dan 0.5 µl primer (Caspase-9), dilakukan triplicate sampel pada 96 well sampel dimana b-actin sebagai negatif control kemudian tambahkan 2 µl sampel c-DNA tutup plate dengan *MicroAmp Optical Adhesive Film*, vortex sebentar dan masukkan dalam mesin RT-PCR.

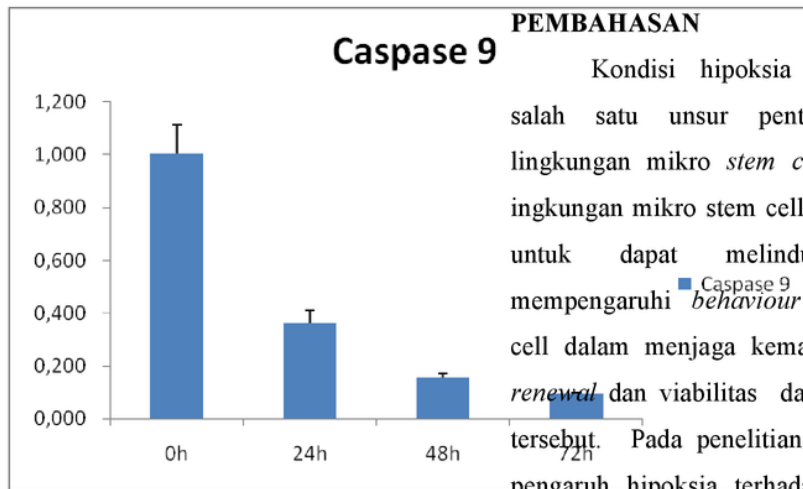
Pengolahan dan Analisis Data

Data yang didapat hanya berupa satu jenis data yaitu secara kuantitatif dengan skala data numerik. Sehingga bila berdistribusi normal maka dapat dilakukan dengan pengujian Multivariat Anova

HASIL PENELITIAN

Telah dilakukan penelitian eksperimental laboratorik secara *in vitro* tentang pengaruh hipoksia terhadap hambatan kejadian apoptosis melalui ekspresi caspase 9 di *Institute Tropical Disease (ITD)*,RSU Dr Soetomo dan Hiroshima University Japan dengan cara menganalisis pengaruh hipoksia terhadap apoptosis melalui ekspresi Caspase 9 melalui pemeriksaan RT-PCR.

Pengaruh hipoksia terhadap ekspresi Caspase 9 pada kultur *MSCs* melalui pemeriksaan RT-PCR dengan β-actin sebagai kontrol negatif (NC) tampak pada gambar 1 dan tabel 1.



Gb.1. Hasil pemeriksaan dengan menggunakan RT-PCR menunjukkan adanya penurunan ekspresi Caspase 9 secara signifikan ($p < 0.05$) pada 24 jam, 48 jam dan 72 jam setelah prekondisi hipoksia (O_2 1%) dibandingkan kondisi normoksia (0 jam).

Tabel 1. Nilai rerata, simpangan baku, dan nilai p dari Caspase 9 setelah diprekondisi hipoksia selama 0 jam (kontrol), 24 jam, 48 jam dan 72 jam

Hypoxia	Caspase 9		
	\bar{X}	SD	P Value
0h	1.004	0.108	1.0000
24h	0.364	0.047	0.0007
48h	0.157	0.015	0.0002
72h	0.125	0.009	0.0001

PEMBAHASAN

Kondisi hipoksia merupakan salah satu unsur penting dalam lingkungan mikro *stem cells*, karena lingkungan mikro stem cell dibutuhkan untuk dapat melindungi dan mempengaruhi *behaviour* dari stem cell dalam menjaga kemampuan *self renewal* dan viabilitas dari stem cell tersebut. Pada penelitian mengenai pengaruh hipoksia terhadap kejadian apoptosis melalui ekspresi Caspase 9 menunjukkan bahwa prekondisi hipoksia mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap hambatan apoptosis. Hasil pemeriksaan morfologi dengan menggunakan mikroskop elektron (pembesaran 1000x) menunjukkan bahwa *stem cells* yang telah diberi prekondisi hipoksia mempunyai proliferasi lebih lambat, bentuk sel yang lebih besar dan sel mati yang lebih sedikit, sedangkan pada kondisi normoksia bentuk sel lebih kecil dan pipih, lebih cepat berproliferasi sehingga sel lebih cepat *confluent* (padat) sehingga menyebabkan lebih banyak sel yang mati. Hal itu menunjukkan bahwa kultur *stem cells* in vitro juga membutuhkan kondisi perlakuan yang sama dengan kondisi in vivo, karena secara fisiologis *stem cells* membutuhkan konsentrasi oksigen

yang lebih rendah (hipoksia) untuk mempertahankan viabilitas dan kemampuan *self renewal*. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang melaporkan bahwa prekondisi hipoksia pada kultur *MSCs* dapat mempertahankan viabilitas serta dan mempunyai proliferasi *rate* serta kemampuan *self renewal* yang lebih baik.⁶ Secara fisiologis *stem cells* membutuhkan konsentrasi O₂ antara 1% - 7 %, kondisi hipoksia dibutuhkan *stem cells* untuk mempertahankan plastisitasnya atau daya differensianya. Pada kondisi hipoksia kemampuan differensiasi dari *MSCs* tetap terjaga plastisitasnya sedangkan pada kondisi normoksia mengalami penurunan.³

Pada hasil pemeriksaan mengenai pengaruh hipoksia terhadap caspase 9 dengan menggunakan Real Time PCR memperlihatkan hasil dimana prekondisi hipoksia berpengaruh terhadap penurunan ekspresi caspase 9 baik pada 24 jam, 48 jam dan 72 jam setelah perlakuan dibandingkan kondisi normoksia (0 jam). Hal ini menunjukkan bahwa kondisi hipoksia pada sel kultur dapat mengakibatkan terjadinya stress sel yang akan menstimulasi dikeluarkannya HSP 27 yang dapat berperan sebagai anti apoptosis melalui hambatan pelepasan

cytochrom-c dan caspase 9. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya penurunan ekspresi caspase 9 secara signifikan pada 24 jam, 48 jam dan 72 jam setelah prekondisi hipoksia dibanding dengan kondisi normoksia yang justru mengalami peningkatan.

Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Yoon & Gores (2002) dan Charrete (2000) yang menyatakan pemberian prekondisi hipoksia dapat mengakibatkan terjadinya stress sel yang dapat menginduksi terjadinya apoptosis, tetapi disisi lain kondisi stress sel juga akan menstimulasi dikeluarkannya heat shock protein (HSP) yang berperan sebagai antiapoptosis melalui hambatan *cytochrom-c* dan caspase 9.^{5,8,9}

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa prekondisi hipoksia pada kultur *Bone Marrow Mesenchymal stem Cells* dapat menurunkan apoptosis melalui penurunan Caspase 9. Kondisi hipoksia diperlukan pada kultur *stem cells* untuk mempertahankan viabilitas, daya proliferasi dan differensiasi dari *stem cell* sehingga didapatkan *stem cells* yang adaptif sebagai bahan terapi *stem cells* khususnya periodontitis parah dan pada saat ditranplantasikan dapat melekat kuat, bertahan hidup serta berintegrasi dengan lingkungan mikro

sel asal agar keberhasilan terapi dapat tercapai.

DAFTAR PUSTAKA

1. Coppess RP and Stokman MA. Stem cells and the repair of radiation-induced salivary gland damage. *J.Oral Disease*. 2011 March; 17(2) : 143-153.
2. Alcarez TM, Naranjo SS, Jimenez C. 2001. Hypoxia induces the activation of the PI3K/Akt cell survival pathway in PC12 cells – protective role in apoptosis. *J Biol Chem*. 276:22368-74.
3. Bizzari A, Koehler H, Cajlakovic M, Pasic A, Schaupp L, Klimant I, Ribitsch V. 2006. Continuous oxygen monitoring in subcutaneous adipose tissue using microdialysis. *Analytica Chimica Acta*. 573:48-56.
4. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. 2001. Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J*. 81: 685-696.
5. Yoon JG and Gores GJ, 2002. Death receptor apoptosis and the liver. *J Hepatol*. (37): 400-410.
6. Tang YL, Zhang YC, Qian LP, Shen and Philips MI. 2005. Improved Graft Mesenchymal Stem Cell survival in Ischemic Heart with a Hypoxia regulated heoxxygenase1 vector. *J. Am.Coll.Cardiol*. 46:1339-1350.
7. D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Roos BA, Schiller PC, 2006. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone*.39:513-522.
8. Charette SJ,Lavoie JN,Lambert H,Landry J. 2000. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol Cell Biol*. 20(20):7602-12.
9. Arrigo AP. 2005.In search of the molecular mechanism by which small stress proteins counteract apoptosis during cellular differentiation.*J Cell Biochem*. 94(2):241-6

Ekspresi caspase 9 pada kultur Bone Marrow Stem Cell (BMSCs) dengan kondisi hipoksia

ORIGINALITY REPORT

18%

SIMILARITY INDEX

14%

INTERNET SOURCES

13%

PUBLICATIONS

13%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

Submitted to iGroup

Student Paper

4%

2

e-journal.unair.ac.id

Internet Source

2%

3

A. Krinner. "Impact of oxygen environment on mesenchymal stem cell expansion and chondrogenic differentiation", Cell Proliferation, 08/2009

Publication

1%

4

jurnal.unipa.ac.id

Internet Source

1%

5

spandidos-publications.com

Internet Source

1%

6

en.wikipedia.org

Internet Source

1%

7

repub.eur.nl

Internet Source

1%

cdn.intechopen.com

8	Internet Source	1 %
9	link.springer.com Internet Source	1 %
10	W Li, Y Xie, R W-Y Sun, Q Liu, J Young, W-Y Yu, C-M Che, P K Tam, Y Ren. "Inhibition of Akt sensitises neuroblastoma cells to gold(III) porphyrin 1a, a novel antitumour drug induced apoptosis and growth inhibition", British Journal of Cancer, 2009 Publication	1 %
11	Rui E. Castro. "Bile Acids as Modulators of Apoptosis", Hepatotoxicity, 12/12/2007 Publication	1 %
12	jurnal.fk.unand.ac.id Internet Source	<1 %
13	222.124.203.59 Internet Source	<1 %
14	id.scribd.com Internet Source	<1 %
15	repository.unair.ac.id Internet Source	<1 %
16	seminarfarmasi.setiabudi.ac.id Internet Source	<1 %

[yeu.or.id](#)

Exclude quotes On
Exclude bibliography Off

Exclude matches < 5 words

Ekspresi caspase 9 pada kultur Bone Marrow Stem Cell (BMSCs) dengan kondisi hipoksia

GRADEMARK REPORT

FINAL GRADE

/100

GENERAL COMMENTS

Instructor

PAGE 1

PAGE 2

PAGE 3

PAGE 4

PAGE 5

PAGE 6

PAGE 7

PAGE 8